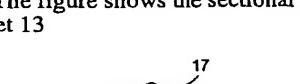


<p>2001-151128/16 B04 D16 HERIKKUSU KENKYUSHO KK 1999.04.14 1999-107234(+1999JP-107234) (2000.10.31) C12N 15/09, C07K 14/515, 14/71, 16/22, C12N 1/15, C12Q 1/02, 1/68, C12P 21/02, C12N 1/19, 1/21, 5/10 // A61K 38/00, 39/395, 48/00, A61P 9/10, 27/02, 29/00, 35/00</p> <p>New genes encoding angiopoietin-like proteins 410 and NEW, useful for the prevention and treatment of diseases relating to angiogenesis C2001-045076</p>	<p>HERI- 1999.04.14 *JP 2000300263-A B(4-E2F, 4-E3F, 4-N4A, 14-H1) D(5-H12E, 5-H17A6) 4</p>	<p>B0131</p>
<p>NOVELTY</p> <p>Angiopoietin-like proteins comprising a fully defined sequence of 493 (S4) or 470 (S8) amino acids as given in the specification, or functional equivalents, are new.</p>	<p>MECHANISM OF ACTION</p> <p>None given.</p>	
<p>DETAILED DESCRIPTION</p> <p>An INDEPENDENT CLAIM is also included for proteins encoded by DNAs capable of hybridizing with DNAs comprising a fully defined 1482 base pair sequence as given in the specification.</p>	<p>USE</p> <p>Prevention and treatment of diseases relating to angiogenesis.</p>	
<p>ACTIVITY</p> <p>Angiogenesis.</p>	<p>EXAMPLE</p> <p>The genes encoding for angiopoietin-like proteins (410 and NEW) were isolated using human embryo derived poly A⁺ RNA as a template with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and encoded proteins with a fully defined sequence of 493 and 470 amino acids as given in the specification.</p>	<p>TECHNOLOGY FOCUS</p> <p>Biotechnology - Further details are disclosed in 6 claims. (26pp079DwgNo.0/8)</p>
		<p>JP 2000300263-A</p>

2001-151129/16 FUJIREBIO KK 1999.04.21 1999-113166(+1999JP-113166) (2000.10.31) C12N 15/09, C12Q 1/68	B04 D16 FJRE 1999.04.21 *JP 2000300268-A 1999.04.21 1999-113166(+1999JP-113166) (2000.10.31) C12N 15/09, C12Q 1/68	B(4-B3B, 4-E1, 11-C8E5, 12-K4F) D(5-H9, 5-H10, 5-H18B) .4 B0132
Measurement of a nucleic acid, comprises hybridizing the target nucleic acid with a crosslinking probe, extending the probe with labeled nucleotides and detecting the label C2001-045077	<p>direction of the 3' terminal of (II) under hybridizing conditions;</p> <p>(c) extending (II) in the presence of a labeled nucleotide by using the region of (II) hybridized with (III) as the primer; and</p> <p>(d) measuring the label taken into the newly extended nucleic acid portion combined to the solid phase, is new.</p> <p>An INDEPENDENT CLAIM is also included for a kit for measuring a target nucleic acid containing at least one (II) and (III).</p>	

2001-151130/16	A96 B07	FUKO- 1999.04.26 *JP 2000300670-A 1999.04.26 1999-118254(+1999JP-118254) (2000.10.31) A61M 5/315 Gasket for disposable syringe has amorphous carbon film at its sliding surface with cylinder inner wall C2001-045078	A(12-H8, 12-V3D) B(5-C6, 11-C2) .2	B0133
NOVELTY		Provides subject sealing to the medical solution.		
DETAILED DESCRIPTION		<p>DESCRIPTION OF DRAWING The figure shows the sectional drawing of gasket. Gasket 13</p> 		
USE		(6pp4054DwgNo.2/8)		
ADVANTAGE		JP 2000300670-A		
Prevents entry of foreign material inside the body of person. Facilitates smooth ejection of medical solution from the cylinder.				

This page blank (use reverse)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-300263

(P2000-300263A)

(43)公開日 平成12年10月31日 (2000.10.31)

(51)Int.Cl.
C 12 N 15/09
C 07 K 14/515
14/71
16/22
C 12 N 1/15

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
C 07 K 14/515
14/71
16/22
C 12 N 1/15

テ-マコード(参考)
4 B 0 2 4
4 B 0 6 3
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数15 OL (全 26 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平11-107234

(22)出願日 平成11年4月14日 (1999.4.14)

(71)出願人 597059742

株式会社ヘリックス研究所
千葉県木更津市矢那1532番地3

(72)発明者 松本 俊一郎

千葉県船橋市本町4-43-2-605

(72)発明者 斎藤 洋子

千葉県木更津市東大田4-5-13-C-
103

(72)発明者 増保 安彦

東京都小金井市東町5-19-15

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 血管新生に関連するタンパク質「410」および「NEW」、ならびに該タンパク質をコードする遺伝子

(57)【要約】

【課題】 新規なアンギオポエチン様タンパク質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 ヒト胎児由来のcDNAから、既知のアンギオポエチンと相同性を有する新規なタンパク質(410およびNEW)を同定した。これらのタンパク質は血管新生の制御への関与が示唆され、血管新生が関与する疾患に対する新しい予防薬や治療薬の開発に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：4または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：4または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項2】 配列番号：3または7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：4または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項3】 請求項1または2に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 請求項3に記載のDNAを含むベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項6】 請求項5に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1または2に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項7】 請求項1または2に記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項8】 請求項1または2に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項9】 配列番号：3または7に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA。

【請求項10】 請求項1または2に記載のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1または2に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、および

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項11】 請求項10に記載の方法により単離されうる、請求項1または2に記載のタンパク質に結合する化合物。

【請求項12】 受容体タンパク質である、請求項11に記載の化合物。

【請求項13】 請求項1または2に記載のタンパク質の受容体を発現する細胞をスクリーニングする方法であって、(a) 請求項1または2に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検細胞試料を接触させる工程、および(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する細胞を選択する工程、を含む方法。

【請求項14】 請求項1または2に記載のタンパク質とその受容体との結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被検試料の存在下で、請求項1または2に記載のタンパク質を該タンパク質の受容体または該受容体を発現する細胞に接触させる工程、

(b) 該タンパク質とその受容体または該受容体を発現する細胞との結合活性を検出する工程、および(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項15】 請求項14に記載の方法により単離されうる、請求項1または2に記載のタンパク質とその受容体との結合を阻害する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、血管新生に関するタンパク質と相同性を有する新規なタンパク質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 血管の形成過程は、胎生初期での"脈管形成(vascular genes is)"と、同後期での"血管新生(angiogenesis)"の二段階に分類される [W. Risau, *Nature*, 386: 671-674 (1997); D. Hanahan, *Science*, 277: 48-50 (1997)]。両過程ではレセプター型チロシン・キナーゼ(RTK)の関与が示唆されており、脈管形成では血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)とそれに対する特異的な細胞膜上受容体(VEGF-R1, VEGF-R2)が重要な役割を果たしている事がノックアウトマウスの実験より証明されている [F. Shalaby et al., *Nature*, 376: 62-66 (1995)]。一方、血管新生の過程でもRTKタイプの細胞膜上受容体、"Tie"の関与が想定されている。TieにはTie-1とTie-2が存在するが、マウスを用いたノックアウト実験で脈管形成不全による致死を誘発することから、両分子共に血管造成における必須の因子であるとされている [T. N. Sato et al., *Nature*, 376: 70-74 (1995); M. C. Puri et al., *EMBO J.*, 14: 5884-5891 (1995)]。

【0003】 Tie-2の特異的なリガンドは、アメリカの研究グループにより遺伝子クローニングがなされ、アンギオポエチン-1(Angiopoietin-1) [S. Davis et al., *Cell*, 87: 1161-1169 (1996)]およびアンギオポエチン-2(Angiopoietin-2) [P. C. Maisonpierre et al., *Science*, 277: 55-60 (1997)]と名付けられた。アンギオポエチン-1(Ang-1)はTie-2結合を介して血管内皮細胞に働きかけ、VEGFにより構築された幼若血管をより成熟な血管へと分化誘導する。アンギオポエチン-1の過剰発現動物を用いた実験では、血管が巨大化し、数が増え、また分岐が多くなる事が観察されている [C. Suri et al., *Science*, 282: 468-471 (1998)]。アンギオポエチン-2(Ang-2)はアンギオポエチン-1/Tie-2系での生理的阻害物質であると考えられており、アンギオポエチン-1と競合的に働き、脈管形成、形態維持を制御していると考えられている [P. C. Maisonpierre et al., *Science*, 277: 55-60 (1997)]。他方、Tie-1に対する特異

的なりガンドは未同定である。血管新生に関与する未知の因子のクローニングが望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、新規なアンギオポエチン様タンパク質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、ヒト胎児由来のpoly A⁺ RNAを用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により、2つの新規なcDNAを単離することに成功した(この2つのクローンをそれぞれ「410」および「NEW」と命名した)。

【0006】単離したcDNAによりコードされる「410」タンパク質および「NEW」タンパク質のアミノ酸配列は、血管新生に関与するタンパク質であるアンギオポエチン-1およびアンギオポエチン-2と相同意を有していた(図1~4)。特に、ヒトアンギオポエチン-1および-2において生物活性を有していると考えられているC末端領域のフィブリノーゲンドメインは、「410」タンパク質および「NEW」タンパク質のC末端領域でも保存されていた(図5~8)。「410」タンパク質および「NEW」タンパク質のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列は、ヒトアンギオポエチン-1および-2と40%以上の同一性を有しており、N末端領域よりも高度に保存されていた。また、「410」タンパク質および「NEW」タンパク質のアミノ酸配列には、アンギオポエチン-1および-2で保存されているシテイン残基6部位のうち、5部位が保存されていた。これらのことから、「410」タンパク質および「NEW」タンパク質は、血管新生に関与するアンギオポエチニアミリーに属する新規なタンパク質と考えられる。

【0007】本発明者らは、「410」タンパク質および「NEW」タンパク質とアンギオポエチンとの密接な関係から、これらタンパク質やそれらの遺伝子、さらにはこれらタンパク質の活性を調節する化合物が、血管新生が関与する各種疾患の治療などへ応用しうることを見出した。

【0008】すなわち、本発明は、新規なアンギオポエチン様タンパク質およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、(1) 配列番号：4または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、付加、挿入および/または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：4または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、(2) 配列番号：3または7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパ

ク質であって、配列番号：4または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(3) (1) または(2) に記載のタンパク質をコードするDNA、(4) (3) に記載のDNAを含むベクター、(5) (4) に記載のベクターを保持する形質転換体、(6) (5) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) または(2) に記載のタンパク質の製造方法、(7) (1) または(2) に記載のタンパク質の部分ペプチド、(8) (1) または(2) に記載のタンパク質に対する抗体、(9) 配列番号：3または7に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、(10) (1) または(2) に記載のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) (1) または(2) に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、および(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、(11) (1) 0に記載の方法により単離されうる、(1) または(2) に記載のタンパク質に結合する化合物、(12) 受容体タンパク質である、(11) に記載の化合物、(13) (1) または(2) に記載のタンパク質の受容体を発現する細胞をスクリーニングする方法であって、(a) (1) または(2) に記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検細胞試料を接触させる工程、および(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する細胞を選択する工程、を含む方法、(14) (1) または(2) に記載のタンパク質とその受容体との結合を阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、(a) 被検試料の存在下で、(1) または(2) に記載のタンパク質を該タンパク質の受容体または該受容体を発現する細胞に接触させる工程、(b) 該タンパク質とその受容体または該受容体を発現する細胞との結合活性を検出する工程、および(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、(15) (14) に記載の方法により単離されうる、(1) または(2) に記載のタンパク質とその受容体との結合を阻害する化合物、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明は、新規なアンギオポエチン様タンパク質「410」および「NEW」に関する。本発明のタンパク質に含まれる「410」タンパク質(配列番号：4) および「NEW」タンパク質(配列番号：8) は、ヒト胎児由来のpoly A⁺ RNAを錆型としてRT-PCRによりcDNAをスクリーニングすることにより単離された遺伝子がコードする分泌性タンパク質である。「410」タンパク質および「NEW」タンパク質のアミノ酸配列は、血管新生の制御に関与するアンギオポエチン-1およびアンギオポエチン-2と相同意を有していた。この事実はこ

れらタンパク質が、特に血管新生の制御に関与しているタンパク質であることを示唆している。従って、本発明のタンパク質やそれらの遺伝子、また、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物は、血管新生が関与する疾患の予防や治療への応用が考えられる。

【0010】血管新生とは、既存血管より新たな血管が構築される過程であると考えられており、生理的には排卵、胎盤形成、炎症、創傷治癒などで起きる。しかし、これら以外にも、血管新生はさまざまな疾患において重要な役割を果すと考えられる。例えば、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、下肢の閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患において、血管新生を誘導し血流を創生することができれば、これらの疾患の治療を行うことができると考えられる。また、逆に血管新生を抑制することで治療を行うことも考えられる。このような対象となる疾患は、癌、糖尿病性網膜症、リュウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症などで、いずれも新生血管の発生と病態の悪性度には相関性がある。特に癌では、例え生体内で細胞が悪性化しても血管新生が起こらなければ、癌細胞の増殖は起こらないと考えられており（こうした癌をdormant tumorと呼ぶ）、血管新生の抑制は、新たな癌治療法として注目されている。

【0011】本発明のアンギオポエチン様タンパク質は、その受容体(群)を介して、それら受容体(群)を活性化または不活化することにより、血管新生の制御に関与していると考えられるため、上記の疾患に対する治療や予防に利用することができると考えられる。さらに、後述するように、本発明のアンギオポエチン様タンパク質を利用してその受容体(群)を単離したり、本発明のタンパク質に応答性を有する細胞を用いて、バイオアッセイにより本発明のタンパク質やその受容体(群)のアゴニストやアンタゴニストをスクリーニングすることが可能となる。本発明のタンパク質の活性を制御するこれら化合物も、また、血管新生が重要な役割を果たす上記疾患の治療や予防のために利用できる。すなわち、血管新生を促進する化合物は、例え、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、下肢の閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患に対する医薬品候補化合物となり、血管新生を抑制する化合物は、例え、癌、糖尿病性網膜症、リュウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症などに対する医薬品候補化合物となる。

【0012】本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組み換えタンパク質は、例え、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することができる。一方、天然のタンパク質は、例え、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Curr

ent Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 16. 1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例え、「On the fidelity of mRNA translation in the nucleic acid-treated rabbit reticulocyte lysate system. Daso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照）などにより本発明のタンパク質を調製することも可能である。

【0013】また、本発明には、「410」タンパク質または「NEW」タンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が「410」タンパク質または「NEW」タンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。「410」タンパク質または「NEW」タンパク質が持つ生物学的特性としては、アンギオポエチンのアミノ酸配列と有意な相同性を有し（実施例参照）、分泌性タンパク質として機能するという特性が挙げられる。また、受容体に結合し、受容体を活性化または不活化するという特性が挙げられる。さらに、脈管形成および／または血管新生を制御する特性も考えられる。具体的には血管の形成、形態維持、新生、および／または消失（regression）を調節する活性が考えられる。このような活性には、血管内皮細胞（管腔を形成していないang iob lastも含む）や造血細胞の分化、増殖、遊走および／または生存維持を調節する活性などが含まれる。さらに発生における血管内皮細胞の脱落阻止、出血阻止、および／または心臓の発育を調節する活性なども考えられる。また、プラスミノーゲンアクチベーターやコラゲナーゼを含むプロテアーゼ活性の調節、コラーゲンゲル中における血管様構造の形成の調節、Milesアッセイ等による血管透過性の調節などの活性も考えられる。

【0014】「410」タンパク質または「NEW」タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、当業者であれば、例え、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例え、部位特異的変異誘発法（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wiley & Sons Section 8.1-8.5））を利用して調製することができる。また、このようなタンパク質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。本発明には、このように「410」タンパク質（配列番号：4）または「NEW」タンパク質（配列番号：8）のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異したタンパク質であって、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質も含まれる。

【0015】タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ま

しくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。

【0016】また、「410」タンパク質または「NEW」タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4) を用いて「410」または「NEW」をコードするDNA配列 (それぞれ配列番号：3または7) またはその一部をもとにこれと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることは、通常行いうことである。このように「410」タンパク質または「NEW」タンパク質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAにコードされるタンパク質であって、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

【0017】機能的に同等なタンパク質を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0018】機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリングエンシーは、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリングエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリングエンシーを実現することが可能である。

【0019】このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるタンパク質は、通常、「410」タンパク質または「NEW」タンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは90%以上の配列の相同性を指す。相同性の特定は、BLAST検索アルゴリズムを用いて決定することができる。

【0020】また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて「410」タンパク質または「NEW」タンパク質をコードするDNA配列 (それぞれ配列番号：3または7) の一部をもとにプライマーを設計し、これらタンパク質をコードするDNA配列またはその一部と相同性の

高いDNA断片を単離して、これを基にこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも可能である。

【0021】本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、例えば、シグナルペプチドが除去されたタンパク質が含まれる。また、本発明のタンパク質の競合阻害剤として機能する、受容体との結合能を有するが受容体を活性化する能力のない部分ペプチドが含まれる。また、抗体調製のための抗原ペプチドが含まれる。部分ペプチドが本発明のタンパク質に特異的であるためには、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、より好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、本発明のタンパク質に対する抗体や本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明のタンパク質に結合する受容体のスクリーニングなどに利用し得る。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適當なペプチダーゼで切断することによって製造する。

【0022】また、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAとしては、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。本発明のDNAは、上記のように、「410」タンパク質または「NEW」タンパク質をコードするDNA配列 (それぞれ配列番号：3または7) あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらDNA配列をもとに合成したプライマーを用いたPCR法等の常法により単離することが可能である。

【0023】また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター (Stratagene社製) などが好ましい。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でタンパク質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター (Promega社製) 、大腸菌であればpETベクター (Invitrogen社製) 、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター (GenBank Accession No. AB009864) 、生物個体であればpME18Sベクター (Mol Cell Biol. 8:466~472(1988)) などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は常法により、例えば制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John W.

iley & Sons. Section 11.4~11.11)。

【0024】また、本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限ではなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。タンパク質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などを例示することができる。

【0025】宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リソ酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。

【0026】また、本発明は、本発明のタンパク質をコードする配列番号：3または7に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNAに関する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは厳格な条件下で、本発明のタンパク質をコードする配列番号：3または7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズし、他のタンパク質をコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。このようなDNAは、本発明のDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。

【0027】本発明のDNAは、本発明のタンパク質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、本発明のDNAをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、発現異常を検査したり、本発明のDNAをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりゲノムDNA-PCRやRT-PCRにより本発明のタンパク質をコードするDNAやその発現制御領域を増幅し、RFLP解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、配列の異常を検査・診断することができる。

【0028】また、「配列番号：3または7に記載のDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスDNAには、本発明のタンパク質の異常（機能異

常や発現異常）などに起因した疾患（特に、血管新生に関連した疾患）の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンスDNAは、例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：3または7に記載のDNA）の配列情報を基にホスホロチオエート法 (Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21(1988)) などにより調製することができる。

【0029】本発明のDNAは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やinvivo法などにより患者へ投与を行なうことができる。

【0030】また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

【0031】本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従いアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成して家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13)、一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製したタンパク質を用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

【0032】本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

【0033】また、本発明のタンパク質に結合する抗体を、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものに入れ替えたマウス（例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Mendez, M.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156」参照）に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化

抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

【0034】また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、

(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

【0035】具体的な方法としては、例えば、本発明のタンパク質のアフィニティカラムに被検試料を接触させ精製する方法、twoハイブリッドシステムを利用する方法、ウエストウエスタンプロッティング法、コンビナトリアルケミストリー技術におけるハイスループットスクリーニングによる方法など多くの公知の方法を利用することができる。

【0036】スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。

【0037】このスクリーニング方法によれば、本発明のタンパク質の受容体を単離することが可能である。本発明のタンパク質の受容体を単離するためのスクリーニングを行う場合、被検試料としては、例えば受容体が発現していることが予想される細胞（例えば血管内皮細胞など）の細胞抽出物や、該細胞から調製したRNAを基に作製したcDNA発現ライブラリーを用いることが可能である。アンギオポエチン-1やアンギオポエチン-2は、それらの受容体として受容体型チロシンキナーゼであるTie-2に結合することが知られている。本発明のタンパク質もまた、受容体型チロシンキナーゼに結合し、細胞内へシグナル伝達を行っている可能性が高い。また、このスクリーニング方法によれば、本発明のタンパク質の受容体のアゴニストやアンタゴニストの候補となる化合物を単離することも可能である。

【0038】また、本発明は、本発明のタンパク質の受容体を発現する細胞をスクリーニングする方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検細胞試料を接触させる工程、および(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する細胞を選択する工程、を含む。

【0039】このスクリーニングは、例えば、以下のように行うことが可能である。まず、本発明のタンパク質の精製品を取得する。次いで、その精製タンパク質を標識し、各種細胞株または初代培養細胞に対して結合アッセイを行い、これにより受容体を発現している細胞を選定する（本庶・新井・谷口・村松編 新生化学実験講座7 増殖分化因子とその受容体 p203-236 (1991) 東京化学同人）。標識としては、¹²⁵IなどのRT標識のほか、酵

素（アルカリホスファターゼ等）標識も可能である。また、本発明のタンパク質を標識せずに用いて、本発明のタンパク質に対する抗体を標識して用いて検出することも考えられる。

【0040】Ang-1の受容体であるTie-2を発現する細胞は、正常ヒト静脈内皮細胞（HUVEC, human umbilical vein endothelial cell、宝酒造販売）等が知られているので、「410」タンパク質または「NEW」タンパク質の受容体を発現する細胞も血管内皮細胞である可能性が高い。それらの細胞を用いれば、Ang-1やAng-2と受容体との結合活性等の比較を行うことができる。また、HUVECで「410」または「NEW」タンパク質とAng-1やAng-2との結合活性等の比較を行うことは当然可能である。

【0041】上記スクリーニングにより得られた本発明のタンパク質の受容体を発現する細胞は、後述するように該受容体のアゴニストやアンタゴニストのスクリーニングに用いることが可能である。

【0042】上記のスクリーニングにより本発明のタンパク質の受容体や該受容体を発現する細胞が得られれば、本発明のタンパク質とその受容体または該受容体を発現する細胞との結合活性を指標に、該結合を阻害する化合物（例えば、受容体アゴニストやアンタゴニスト）のスクリーニングが可能となる。

【0043】このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で、本発明のタンパク質を該タンパク質の受容体または該受容体を発現する細胞に接触させる工程、(b) 該タンパク質とその受容体または該受容体を発現する細胞との結合活性を検出する工程、および(c) 被検試料非存在下において検出した場合と比較して、該結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

【0044】スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明のタンパク質との結合活性を指標とした上記のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。

【0045】例えば、アイソトープラベルした「410」タンパク質または「NEW」タンパク質と被検試料を、これらタンパク質の受容体を発現する細胞に接触させ、これらタンパク質のその受容体への結合活性を検出する。そして、アイソトープラベルしたこれらタンパク質の細胞当たりの結合活性を低下させる化合物を選択する。

【0046】このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明のタンパク質の受容体のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。本発明のタンパク質とその受容体との結合活性の低下によるリン酸化などの細胞内シグナルの変化をもとに、得られた化合物が本発明のタンパク質の受容体のアゴニストであるかアンタゴニストであるかを判定することができる。また、得られる化合物

は、生体内において、本発明のタンパク質とこれと相互作用する分子(受容体も含む)との該相互作用を阻害する化合物の候補ともなる。これら化合物は、本発明のタンパク質が関連する疾患(例えは、血管新生に関連する疾患)の予防薬や治療薬への応用が考えられる。

【0047】本発明のスクリーニング方法により単離された化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えは、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0048】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法(Manatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従って実施可能である。

【0049】【実施例1】新規アンギオポエチン様タンパク質をコードする遺伝子の単離
本発明のアンギオポエチン様タンパク質(410、NEW)をコードする全長cDNAは、ヒト胎児由来のpoly A⁺ RNA(ClonTech)を錆型としてRT-PCRにより取得した。

【0050】新規アンギオポエチン様タンパク質「410」の増幅にはforwardプライマーとして5'-ATGAGGCCACTCTCCGTGAC-3'(配列番号:1)、reverseプライマーとして5'-TTACTGGAAGGTGTTGGGTTCG-3'(配列番号:2)を用いた。RT-PCRはPyrobest DNA polymerase(宝酒造)を用い94°C(30秒)/60°C(30秒)/72°C(2分)のサイクルを35回繰り返した。その結果、約1.5 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をpCR2.1プラスミド(Invitrogen)を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はダイデオキシターミネーション法によりABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems)を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号:3に示す。

【0051】同配列は1482 baseのオープンリーディングフレーム(配列番号:3の第1番目から第1482番目)を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(493アミノ酸)を配列番号:4に示す。

【0052】新規アンギオポエチン様タンパク質「NEW」の増幅にはforwardプライマーとして5'-ATGGGGAAAGCCCTGGCTGCGTGCCTACAG-3'(配列番号:5)、reverseプライマーとして5'-TCACAGCTTCAGGGGCCAATGACCATGGC-3'(配列番号:6)を用いた。RT-PCRはPyrobest DNA polymerase(宝酒造)を用い5%ホルムアミド存在下で98°C(20秒)/64°C(30秒)/74°C(3分)のサイクルを35回繰り返した。その結果、約1.5 kbpのDNA断片が増幅された。この断片をpCR2.1プラスミド(Invitrogen)を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はダイデオキシターミネーション法によりABI377 DNA Sequencer(Applied Biosystems)を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号:7に示す。

【0053】同配列は1413 baseのオープンリーディングフレーム(配列番号:7の第1番目から第1413番目)を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列(470アミノ酸)を配列番号:8に示す。

【0054】【実施例2】「410」、「NEW」のアミノ酸配列よりの機能予測

(1) 「410」のアミノ酸配列とヒトアンギオポエチン-1(Ang1)mRNA complete cds.(U83508, 2149塩基, 498アミノ酸)およびヒトアンギオポエチン-2(Ang2)mRNA complete cds.(AF004327, 2269塩基, 496アミノ酸)のアミノ酸配列に対するALIGN(calculate a global alignment of two sequences)[Myers and Miller, CABIOS(1989); FASTA2(ftp://ftp.virginia.edu/pub/fasta/)と共にプログラムをダウンロード可能]による検索を行った。その結果を図1および2に示した。「410」のアミノ酸配列(上段)が、Human ang iopoietin-1(図1下段)およびHuman ang iopoietin-2(図2下段)のアミノ酸配列と、28.7%および28.2%の相同意を示した。これらのことから「410」が血管新生に関与するアンギオポエチン(Ang iopoietin)のファミリーである可能性が高い遺伝子であることが示唆された。

【0055】(2)「NEW」のアミノ酸配列とヒトアンギオポエチン-1(Ang1)およびヒトアンギオポエチン-2(Ang2)のアミノ酸配列に対するALIGNによる検索を行った結果を図3および4に示した。「NEW」のアミノ酸配列(上段)が、Human ang iopoietin-1(図3下段)およびHuman ang iopoietin-2(図4下段)のアミノ酸配列と、28.8%および27.2%の相同意を示した。これらのことから「410」が血管新生に関与するアンギオポエチン(Ang iopoietin)のファミリーである可能性が高い遺伝子であることが示唆された。

【0056】(3)「410」、「NEW」のアミノ酸配列よりの機能予測

ヒトアンギオポエチン-1およびヒトアンギオポエチン-2の生物活性は分子内C末端領域に存在するフィブリノゲンドメインに存在すると考えられている[D.M. Valenz

uel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 1904-1909 (1999)】。「410」、「NEW」にも同様のフィブリノーゲンドメイン（それぞれアミノ酸番号275-460および257-441）が分子内C末端領域に存在している。この領域について、ヒトアンギオポエチン-1およびヒトアンギオポエチン-2のフィブリノーゲンドメイン（それぞれアミノ酸番号282-468および281-467）のALIGNによる検索を行った。その結果を図5から8に示した。「410」、「NEW」のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列は、Human ang iopo iet in-1およびHuman ang iopo iet in-2と、いずれも40%以上保存されており、分子内N末端よりも特に良く保存されていたことから、アンギオポエチン同様の生物活性を有する可能性が考えられた。

【0057】さらに、Ang1のアミノ酸番号で41, 286, 315, 439, および452であり、Ang2のアミノ酸番号で41, 284, 313, 437, および450であるシステイン残基が、「410」でもアミノ酸番号で54, 278, 307, 430, および443、「NEW」ではアミノ酸番号で37, 260, 287, 410, および423で存在していた。この結果は、ヒトAng1およびAng2、並びにマウスAng1およびAng2で共通に保存されているシステイン残基8個。
[P. C. Maisonneuve et al.

1., Science, 277: 55-60 (1997)]のうち5個が「410」、「NEW」でも存在していることを示している。残りのAng1およびAng2で保存されているシステイン残基3個のうち2個はCys-X-Cys-X-Cysの2個であった。このことより、Ang1およびAng2で保存されているシステイン残基6部位のうち、「410」、「NEW」では5部位に存在していることが分かった。

【0058】これらのことから「410」、「NEW」が血管新生に関与するアンギオポエチン (Ang iopo iet in) のファミリーである可能性が高いタンパク質であることが示唆された。

【0059】

【発明の効果】本発明のタンパク質は、血管新生の制御に関与していることが示唆されるため、本発明のタンパク質やそれらの遺伝子、または本発明のタンパク質や受容体の活性を制御する化合物は、血管新生が関与する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

【0060】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Helix Research Institute
<120> "410" and "NEW", proteins related to angiogenesins
and genes encoding them.
<130> H1-104
<140>
<141>
<160> 8
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence
<400> 1
atgaggccac tgcgtgcgtac
<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence
<400> 2
tttagtggaaag gtgttgggt tcg
<210> 3
<211> 1482

```

17

18

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1482)
 <400> 3

atg agg cca ctg tgc gtc aca tgc tgg tgg ctc gga ctg ctg gct gcc	48
Met Arg Pro Leu Cys Val Thr Cys Trp Trp Leu Gly Leu Leu Ala Ala	
1 5 10 15	
atg gga gct gtt gca ggc cag gag gac ggt ttt gag ggc act gag gag	96
Met Gly Ala Val Ala Gly Gln Glu Asp Gly Phe Glu Gly Thr Glu Glu	
20 25 30	
ggc tcg cca aga gag ttc att tac cta aac agg tac aag cgg gcg ggc	144
Gly Ser Pro Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Asn Arg Tyr Lys Arg Ala Gly	
35 40 45	
gag tcc cag gac aag tgc acc tac acc ttc att gtg ccc cag cag cgg	192
Glu Ser Gln Asp Lys Cys Thr Tyr Phe Ile Val Pro Gln Gln Arg	
50 55 60	
gtc acg ggt gcc atc tgc gtc aac tcc aag gag cct gag gtg ctt ctg	240
Va1 Thr Gly Ala Ile Cys Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Val Leu Leu	
65 70 75 80	
gag aac cga gtg cat aag cag gag cta gag ctg ctc aac aat gag ctg	288
Glu Asn Arg Val His Lys Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asn Asn Glu Leu	
85 90 95	
ctc aag cag aag cgg cag atc gag acg ctg cag cag ctg gtg gag gtg	336
Leu Lys Gln Lys Arg Gln Ile Glu Thr Leu Gln Gln Leu Val Glu Val	
100 105 110	
gac ggc ggc att gtg agc gag gtg aag ctg ctg cgc aag gag agc cgc	384
Asp Gly Gly Ile Val Ser Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys Glu Ser Arg	
115 120 125	
aac atg aac tcg cgg gtc acg cag ctc tac atg cag ctc ctg cac gag	432
Asn Met Asn Ser Arg Val Thr Gln Leu Tyr Met Gln Leu Leu His Glu	
130 135 140	
atc atc cgc aag cgg gac aac gcg ttg gag ctc tcc cag ctg gag aac	480
Ile Ile Arg Lys Arg Asp Asn Ala Leu Glu Leu Ser Gln Leu Glu Asn	
145 150 155 160	
agg atc ctg aac cag aca gcc gac atg ctg cag ctg gcc agc aag tac	528
Arg Ile Leu Asn Gln Thr Ala Asp Met Leu Gln Leu Ala Ser Lys Tyr	
165 170 175	
aag gac ctg gag cac aag tac cag cac ctg gcc aca ctg gcc cac aac	576
Lys Asp Leu Glu His Lys Tyr Gln His Leu Ala Thr Leu Ala His Asn	
180 185 190	
caa tca gag atc atc gcg cag ctt gag gag cac tgc cag agg gtg ccc	624
Gln Ser Glu Ile Ile Ala Gln Leu Glu Glu His Cys Gln Arg Val Pro	
195 200 205	
tcg gcc agg ccc gtc ccc cag cca ccc ccc gct gcc ccg ccc cgg gtc	672
Ser Ala Arg Pro Val Pro Gln Pro Pro Pro Ala Ala Pro Pro Arg Val	
210 215 220	
tac caa cca ccc acc tac aac cgc atc atc aac cag atc tct acc aac	720
Tyr Gln Pro Pro Thr Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Gln Ile Ser Thr Asn	

19

20

225	230	235	240	
gag atc cag agt gac gag aac ctg aag gtg ctg cca ccc cct ctg ccc				768
Glu Ile Gln Ser Asp Gln Asn Leu Lys Val Leu Pro Pro Pro Leu Pro				
245	250	255		
act atg ccc act ctc acc agc ctc cca tct tcc acc gac aag ccg tcg				816
Thr Met Pro Thr Leu Thr Ser Leu Pro Ser Ser Thr Asp Lys Pro Ser				
260	265	270		
ggc cca tgg aga gac tgc ctg cag gcc ctg gag gat ggc cac gac acc				864
Gly Pro Trp Arg Asp Cys Leu Gln Ala Leu Glu Asp Gly His Asp Thr				
275	280	285		
agc tcc atc tac ctg gtg aag ccg gag aac acc aac cgc ctc atg cag				912
Ser Ser Ile Tyr Leu Val Lys Pro Glu Asn Thr Asn Arg Leu Met Gln				
290	295	300		
gtg tgg tgc gac gag aga cac gac ccc ggg ggc tgg acc gtc atc cag				960
Val Trp Cys Asp Gln Arg His Asp Pro Gly Trp Thr Val Ile Gln				
305	310	315	320	
aga cgc ctg gat ggc tct gtt aac ttc ttc agg aac tgg gag acg tac				1008
Arg Arg Leu Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Arg Asn Trp Glu Thr Tyr				
325	330	335		
aag caa ggg ttt ggg aac att gat ggc gaa tac tgg ctg ggc ctg gag				1056
Lys Gln Gly Phe Gly Asn Ile Asp Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Leu Glu				
340	345	350		
aac att tac tgg ctg acg aac caa ggc aac tac aaa ctc ctg gtg acc				1104
Asn Ile Tyr Trp Leu Thr Asn Gln Gly Asn Tyr Lys Leu Leu Val Thr				
355	360	365		
atg gag gac tgg tcc ggc cgc aaa gtc ttt gca gaa tac gcc agt ttc				1152
Met Glu Asp Trp Ser Gly Arg Lys Val Phe Ala Glu Tyr Ala Ser Phe				
370	375	380		
cgc ctg gaa cct gag agc gag tat tat aag ctg cgg ctg ggg cgc tac				1200
Arg Leu Glu Pro Glu Ser Glu Tyr Tyr Lys Leu Arg Leu Gly Arg Tyr				
385	390	395	400	
cat ggc aat gcg ggt gac tcc ttt aca tgg cac aac ggc aag cag ttc				1248
His Gly Asn Ala Gly Asp Ser Phe Thr Trp His Asn Gly Lys Gln Phe				
405	410	415		
acc acc ctg gac aga gat cat gat gtc tac aca gga aac tgt gcc cac				1296
Thr Thr Leu Asp Arg Asp His Asp Val Tyr Thr Gly Asn Cys Ala His				
420	425	430		
tac cag aag gga ggc tgg tgg tat aac gcc tgt gcc cac tcc aac ctc				1344
Tyr Gln Lys Gly Trp Trp Tyr Asn Ala Cys Ala His Ser Asn Leu				
435	440	445		
aac ggg gtc tgg tac cgc ggg ggc cat tac cgg agc cgc tac cag gag				1392
Asn Gly Val Trp Tyr Arg Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp				
450	455	460		
gga gtc tac tgg gct gag ttc cga gga ggc tct tac tca ctc aag aaa				1440
Gly Val Tyr Trp Ala Glu Phe Arg Gly Ser Tyr Ser Leu Lys Lys				
465	470	475	480	
gtg gtg atg atg atc cga ccg aac ccc aac acc ttc cac taa				1482
Val Val Met Met Ile Arg Pro Asn Pro Asn Thr Phe His				
485	490			

21

<210> 4
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Arg Pro Leu Cys Val Thr Cys Trp Trp Leu Gly Leu Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Met Gly Ala Val Ala Gly Gln Glu Asp Gly Phe Glu Gly Thr Glu Glu
 20 25 30
 Gly Ser Pro Arg Glu Phe Ile Tyr Leu Asn Arg Tyr Lys Arg Ala Gly
 35 40 45
 Glu Ser Gln Asp Lys Cys Thr Tyr Thr Phe Ile Val Pro Gln Gln Arg
 50 55 60
 Val Thr Gly Ala Ile Cys Val Asn Ser Lys Glu Pro Glu Val Leu Leu
 65 70 75 80
 Glu Asn Arg Val His Lys Gln Glu Leu Glu Leu Leu Asn Asn Glu Leu
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Arg Gln Ile Glu Thr Leu Gln Gln Leu Val Glu Val
 100 105 110
 Asp Gly Gly Ile Val Ser Glu Val Lys Leu Leu Arg Lys Glu Ser Arg
 115 120 125
 Asn Met Asn Ser Arg Val Thr Gln Leu Tyr Met Gln Leu Leu His Glu
 130 135 140
 Ile Ile Arg Lys Arg Asp Asn Ala Leu Glu Leu Ser Gln Leu Glu Asn
 145 150 155 160
 Arg Ile Leu Asn Gln Thr Ala Asp Met Leu Gln Leu Ala Ser Lys Tyr
 165 170 175
 Lys Asp Leu Glu His Lys Tyr Gln His Leu Ala Thr Leu Ala His Asn
 180 185 190
 Gln Ser Glu Ile Ile Ala Gln Leu Glu Glu His Cys Gln Arg Val Pro
 195 200 205
 Ser Ala Arg Pro Val Pro Gln Pro Pro Ala Ala Pro Pro Arg Val
 210 215 220
 Tyr Gln Pro Pro Thr Tyr Asn Arg Ile Ile Asn Gln Ile Ser Thr Asn
 225 230 235 240
 Glu Ile Gln Ser Asp Gln Asn Leu Lys Val Leu Pro Pro Pro Leu Pro
 245 250 255
 Thr Met Pro Thr Leu Thr Ser Leu Pro Ser Ser Thr Asp Lys Pro Ser
 260 265 270
 Gly Pro Trp Arg Asp Cys Leu Gln Ala Leu Glu Asp Gly His Asp Thr
 275 280 285
 Ser Ser Ile Tyr Leu Val Lys Pro Glu Asn Thr Asn Arg Leu Met Gln
 290 295 300
 Val Trp Cys Asp Gln Arg His Asp Pro Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln
 305 310 315 320
 Arg Arg Leu Asp Gly Ser Val Asn Phe Phe Arg Asn Trp Glu Thr Tyr
 325 330 335
 Lys Gln Gly Phe Gly Asn Ile Asp Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Leu Glu
 340 345 350
 Asn Ile Tyr Trp Leu Thr Asn Gln Gly Asn Tyr Lys Leu Leu Val Thr

22

23

24

355	360	365	
Met Glu Asp Trp Ser Gly Arg Lys Val Phe Ala Glu Tyr Ala Ser Phe			
370	375	380	
Arg Leu Glu Pro Glu Ser Glu Tyr Tyr Lys Leu Arg Leu Gly Arg Tyr			
385	390	395	400
His Gly Asn Ala Gly Asp Ser Phe Thr Trp His Asn Gly Lys Gln Phe			
405	410	415	
Thr Thr Leu Asp Arg Asp His Asp Val Tyr Thr Gly Asn Cys Ala His			
420	425	430	
Tyr Gln Lys Gly Gly Trp Trp Tyr Asn Ala Cys Ala His Ser Asn Leu			
435	440	445	
Asn Gly Val Trp Tyr Arg Gly Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp			
450	455	460	
Gly Val Tyr Trp Ala Glu Phe Arg Gly Gly Ser Tyr Ser Leu Lys Lys			
465	470	475	480
Val Val Met Met Ile Arg Pro Asn Pro Asn Thr Phe His			
485	490		
<210> 5			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially			
Synthesized Primer Sequence			
<400> 5			
atggggaaagc cctggctgctg tgcgtacag			
30			
<210> 6			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Description of Artificial Sequence: Artificially			
Synthesized Primer Sequence			
<400> 6			
tcacagcttc agggccgaa tgagcatggc			
30			
<210> 7			
<211> 1413			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1) ..(1413)			
<400> 7			
atg ggg aag ccc tgg ctg cgt gcg cta cag ctg ctg ctc ctg ctg ggc			
48			
Met Gly Lys Pro Trp Leu Arg Ala Leu Gln Leu Leu Leu Leu Gly			
1	5	10	15
gcg tcg tgg gcg cgg gcg ggc gcc ccg cgc tgc acc tac acc ttc gtg			
96			
Ala Ser Trp Ala Arg Ala Gly Ala Pro Arg Cys Thr Tyr Thr Phe Val			
20	25	30	
ctg ccc ccg cag aag ttc acg ggc gct gtg tgc tgg agc ggc ccc gca			
144			

Leu Pro Pro Gln Lys Phe Thr Gly Ala Val Cys Trp Ser Gly Pro Ala
 35 40 45
 tcc acg cgg gcg acg ccc gag gcc gcc aac gcc agc gag ctg gcg gcg
 Ser Thr Arg Ala Thr Pro Glu Ala Ala Asn Ala Ser Glu Leu Ala Ala
 50 55 60
 ctg cgc atg cgc gtc ggc cgc cac gag gag ctg tta cgc gag ctg cag
 Leu Arg Met Arg Val Gly Arg His Glu Glu Leu Leu Arg Glu Leu Gln
 65 70 75 80
 agg ctg gcg gcg gcc gac ggc gtg gcc ggc gag gtg cgc gcg ctg
 Arg Leu Ala Ala Ala Asp Gly Ala Val Ala Gly Glu Val Arg Ala Leu
 85 90 95
 cgc aag gag agc cgc ggc ctg agc gcg cgc ctg ggc cag ttg cgc gcg
 Arg Lys Glu Ser Arg Gly Leu Ser Ala Arg Leu Gly Gln Leu Arg Ala
 100 105 110
 cag ctg cag cac gag gcg ggg ccc ggg gcg ggc ccg ggg gcg gat ctg
 Gln Leu Gln His Glu Ala Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Asp Leu
 115 120 125
 ggg gcg gag cct gcc gcg gcg ctg ctc ggg gag cgc gtg ctc
 Gly Ala Glu Pro Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Glu Arg Val Leu
 130 135 140
 aac gcg tcc gcc gag gct cag cgc gca gcc cgg ttc cac cag ctg
 Asn Ala Ser Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Arg Phe His Gln Leu
 145 150 155 160
 gac gtc aag ttc cgc gag ctg gcg cag ctc gtc acc cag cag agc agt
 Asp Val Lys Phe Arg Glu Leu Ala Gln Leu Val Thr Gln Gln Ser Ser
 165 170 175
 ctc atc gcc cgc ctg gag cgc ctg tgc ccc gga ggc gcg ggc ggg cag
 Leu Ile Ala Arg Leu Glu Arg Leu Cys Pro Gly Gly Ala Gly Gln
 180 185 190
 cag cag gtc ctg ccc cca ccc cca ctg gtg cct gtg gtt ccg gtc cgt
 Gln Gln Val Leu Pro Pro Leu Val Pro Val Val Pro Val Arg
 195 200 205
 ctt gtg ggt agc acc agt gac acc agt agg atg ctg gac cca gcc cca
 Leu Val Gly Ser Thr Ser Asp Thr Ser Arg Met Leu Asp Pro Ala Pro
 210 215 220
 gag ccc cag aga gac cag acc cag aga cag cag gag ccc atg gct tct
 Glu Pro Gln Arg Asp Gln Thr Gln Arg Gln Gln Glu Pro Met Ala Ser
 225 230 235 240
 ccc atg cct gca ggt cac ccc gtc ccc acc aag cct gtg ggc ccg
 Pro Met Pro Ala Gly His Pro Ala Val Pro Thr Lys Pro Val Gly Pro
 245 250 255
 tgg cag gat tgt gca gag gcc cgc cag gca ggc cat gaa cag agt gga
 Trp Gln Asp Cys Ala Glu Ala Arg Gln Ala Gly His Glu Gln Ser Gly
 260 265 270
 gtg tat gaa ctg cga gtg ggc cgt cac gta gtg tca gta tgg tgt gag
 Val Tyr Glu Leu Arg Val Gly Arg His Val Val Ser Val Trp Cys Glu
 275 280 285
 cag caa ctg gag ggt gga ggc tgg act gtg atc cag cgg agg caa gat
 Gln Gln Leu Glu Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg Arg Gln Asp
 290 295 300

27

28

ggt tca gtc aac ttc ttc act acc tgg cag cac tat aag gcg ggc ttt	960
Gly Ser Val Asn Phe Phe Thr Thr Trp Gln His Tyr Lys Ala Gly Phe	
305 310 315 320	
ggg cgg cca gac gga gaa tac tgg ctg ggc ctt gaa ccc gtg tat cag	1008
Gly Arg Pro Asp Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Leu Glu Pro Val Tyr Gln	
325 330 335	
ctg acc agc cgt ggg gac cat gag ctg ctg gtt ctc ctg gag gac tgg	1056
Leu Thr Ser Arg Gly Asp His Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asp Trp	
340 345 350	
ggg ggc cgt gga gca cgt gcc cac tat gat ggc ttc tcc ctg gaa ccc	1104
Gly Gly Arg Gly Ala Arg Ala His Tyr Asp Gly Phe Ser Leu Glu Pro	
355 360 365	
gag agc gac cac tac cgc ctg cgg ctt ggc cag tac cat ggt gat gct	1152
Glu Ser Asp His Tyr Arg Leu Arg Leu Gly Gln Tyr His Gly Asp Ala	
370 375 380	
gga gac tct ctt tcc tgg cac aat gac aag ccc ttc agc acc gtg gat	1200
Gly Asp Ser Leu Ser Trp His Asn Asp Lys Pro Phe Ser Thr Val Asp	
385 390 395 400	
agg gac cga gac tcc tat tct ggt aac tgt gcc ctg tac cag cgg gga	1248
Arg Asp Arg Asp Ser Tyr Ser Gly Asn Cys Ala Leu Tyr Gln Arg Gly	
405 410 415	
ggc tgg tgg tac cat gcc tgt gcc cac tcc aac ctc aac ggt gtg tgg	1296
Gly Trp Trp Tyr His Ala Cys Ala His Ser Asn Leu Asn Gly Val Trp	
420 425 430	
cac cac ggc cac tac cga agc cgc tac cag gat ggt gtc tac tgg	1344
His His Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp Gly Val Tyr Trp	
435 440 445	
gct gag ttt cgt ggt ggg gca tat tct ctc agg aag gcc gcc atg ctc	1392
Ala Glu Phe Arg Gly Gly Ala Tyr Ser Leu Arg Lys Ala Ala Met Leu	
450 455 460	
att cgg ccc ctg aag ctg tga	1413
Ile Arg Pro Leu Lys Leu	
465 470	
<210> 8	
<211> 470	
<212> PRT	
<213> Homo sapiens	
<400> 8	
Met Gly Lys Pro Trp Leu Arg Ala Leu Gln Leu Leu Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
Ala Ser Trp Ala Arg Ala Gly Ala Pro Arg Cys Thr Tyr Thr Phe Val	
20 25 30	
Leu Pro Pro Gln Lys Phe Thr Gly Ala Val Cys Trp Ser Gly Pro Ala	
35 40 45	
Ser Thr Arg Ala Thr Pro Glu Ala Ala Asn Ala Ser Glu Leu Ala Ala	
50 55 60	
Leu Arg Met Arg Val Gly Arg His Glu Glu Leu Leu Arg Glu Leu Gln	
65 70 75 80	

Arg Leu Ala Ala Ala Asp Gly Ala Val Ala Gly Glu Val Arg Ala Leu
 85 90 95
 Arg Lys Glu Ser Arg Gly Leu Ser Ala Arg Leu Gly Gln Leu Arg Ala
 100 105 110
 Gln Leu Gln His Glu Ala Gly Pro Gly Ala Gly Pro Gly Ala Asp Leu
 115 120 125
 Gly Ala Glu Pro Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Glu Arg Val Leu
 130 135 140
 Asn Ala Ser Ala Glu Ala Gln Arg Ala Ala Ala Arg Phe His Gln Leu
 145 150 155 160
 Asp Val Lys Phe Arg Glu Leu Ala Gln Leu Val Thr Gln Gln Ser Ser
 165 170 175
 Leu Ile Ala Arg Leu Glu Arg Leu Cys Pro Gly Gly Ala Gly Gln
 180 185 190
 Gln Gln Val Leu Pro Pro Pro Leu Val Pro Val Val Pro Val Arg
 195 200 205
 Leu Val Gly Ser Thr Ser Asp Thr Ser Arg Met Leu Asp Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Pro Gln Arg Asp Gln Thr Gln Arg Gln Gln Glu Pro Met Ala Ser
 225 230 235 240
 Pro Met Pro Ala Gly His Pro Ala Val Pro Thr Lys Pro Val Gly Pro
 245 250 255
 Trp Gln Asp Cys Ala Glu Ala Arg Gln Ala Gly His Glu Gln Ser Gly
 260 265 270
 Val Tyr Glu Leu Arg Val Gly Arg His Val Val Ser Val Trp Cys Glu
 275 280 285
 Gln Gln Leu Glu Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln Arg Arg Gln Asp
 290 295 300
 Gly Ser Val Asn Phe Phe Thr Thr Trp Gln His Tyr Lys Ala Gly Phe
 305 310 315 320
 Gly Arg Pro Asp Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Leu Glu Pro Val Tyr Gln
 325 330 335
 Leu Thr Ser Arg Gly Asp His Glu Leu Leu Val Leu Glu Asp Trp
 340 345 350
 Gly Gly Arg Gly Ala Arg Ala His Tyr Asp Gly Phe Ser Leu Glu Pro
 355 360 365
 Glu Ser Asp His Tyr Arg Leu Arg Leu Gly Gln Tyr His Gly Asp Ala
 370 375 380
 Gly Asp Ser Leu Ser Trp His Asn Asp Lys Pro Phe Ser Thr Val Asp
 385 390 395 400
 Arg Asp Arg Asp Ser Tyr Ser Gly Asn Cys Ala Leu Tyr Gln Arg Gly
 405 410 415
 Gly Trp Trp Tyr His Ala Cys Ala His Ser Asn Leu Asn Gly Val Trp
 420 425 430
 His His Gly Gly His Tyr Arg Ser Arg Tyr Gln Asp Gly Val Tyr Trp
 435 440 445
 Ala Glu Phe Arg Gly Gly Ala Tyr Ser Leu Arg Lys Ala Ala Met Leu
 450 455 460
 Ile Arg Pro Leu Lys Leu

465

470

【図面の簡単な説明】

【図1】「410」のアミノ酸配列（493アミノ酸）（上段）とヒトアンギオポエチン-1のアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「410」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-1のアミノ酸配列と、28.7%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"680"であった。

【図2】「410」のアミノ酸配列（493アミノ酸）（上段）とヒトアンギオポエチン-2のアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「410」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-2のアミノ酸配列と、28.2%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"662"であった。

【図3】「NEW」のアミノ酸配列（470アミノ酸）（上段）とヒトアンギオポエチン-1のアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「NEW」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-1のアミノ酸配列と、28.8%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"580"であった。

【図4】「NEW」のアミノ酸配列（470アミノ酸）（上段）とヒトアンギオポエチン-2のアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「NEW」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-2のアミノ酸配列と、27.2%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"578"であった。

【図5】「410」のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列（上段）とヒトアンギオポエチン-1のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「410」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-1のアミノ酸配列と、41.0%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"530"であった。

【図6】「410」のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列（上段）とヒトアンギオポエチン-2のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「410」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-2のアミノ酸配列と、41.2%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"536"であった。

【図7】「NEW」のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列（上段）とヒトアンギオポエチン-1のフィブリノーゲンドメインのアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「NEW」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-1のアミノ酸配列と、42.9%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"531"であった。

【図8】「NEW」のフィブリノーゲンドomainのアミノ酸配列（上段）とヒトアンギオポエチン-2のフィブリノーゲンドomainのアミノ酸配列（下段）とのアライメントを示す図である。「NEW」のアミノ酸配列が、ヒトアンギオポエチン-2のアミノ酸配列と、41.8%の相同性を示した。この時のグローバルアライメントスコア(Global alignment score)は"507"であった。

【図1】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0 Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

"410" (493 aa) vs. Human angiopoietin-1 (498 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
28.7% identity; Global alignment score: 680

	10	20	30	40	50	60
410	MRPLCVTCWLGLLAAMGAVAGQEQEDGFEGTEEGSPREFIYLNRYKRAGESQDKCTYTFIV
Ang1	MTVFLSFAFLAAILTHIGC-SNQR----SPENSGR-----RYNRIQHGQ--CAYTFIL	10	20	30	40	
	70		80	90		
410	PQ-----QRVTGAICVNSK--EP-----EVLLNRVHKQELELLNNELL
Ang1	PEHDGNCRESTTDQYNTNALQRDAPHVEPDFFSSQKLQHLEHVMEN--YTQWLQKLENIV	50	60	70	80	90
	100	110	120	130	140	
410	KQ-KRQIETLQQ-----LVEDGGIVSEVKLLRKESRNMMNSRVTQLYMQLLHEIIR
Ang1	ENMKSEMAQIQQNAVQNHTATMLEIGTSLLSQTA--EQTRKLTDVETQVLNQTSRLEIQ	110	120	130	140	150
	150	160	170	180	190	200
410	KRDNALELSQLENRILNQTADMLQLASKYKDLEHKYQHLATLAHNQSEIIAQLEEHQRV
Ang1	LLENSLSTYKLEKQLLQQTNEILKIHKEKNLLEHKILEMEGKHKEELDTLKEEKENLQGL	170	180	190	200	210
	210	220	230	240	250	260
410	PSARP-VPQPPPAPPVYQPPTYNRIINQISTNEIQSDQNLKVPPPLPTMPTLTSPLS
Ang1	VTRQTYIIQ---ELEKQLNRATTNSVSLQKQQLLEMDSVHNLVNLCCTKEGV-----LKG	230	240	250	260	270
	270	280	290	300	310	320
410	STDKPSGPWRDCLQALEDGHDTSSIYLVKPENTNRLMQVWCDQRHDPGGWTVIQRRLDGS
Ang1	GKREEEKPFRCADCYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKVFCNMVDNGGWTVIQHREDGS	280	290	300	310	320
	330	340	350	360	370	380
410	VNFFRNWETYKQGFGNIDGEYWLGENIYWLTNQGNYKLLVTMEDWSGRKVFAEYASFRL
Ang1	LDFQRGWKEYKMGFGNPGSHEYWLGENEFIFAIITSQRQYMLRIELMDWEGRNRAYSQYDRFHI	340	350	360	370	380
	390	400	410	420	430	440
410	EPESEYYKRLGRYHGNAG--DSFTWHNGKQFTTLDRDHVDYTGNCAHYQKGGWWYNACA
Ang1	GNEKQNYRLYLGHTGTAGKQSSLILH-GADFSTKDADNDNCMKCALMLTGGWWFDACG	400	410	420	430	440
	450	460	470	480	490	
410	HSNLNGWYRGGHYRSRYQDGVYWAERFGGSYSLKVVMMIRPNPNTFH
Ang1	PSNLNGMFYTAGQNHGKL-NGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMIRPLD---F	460	470	480	490	

【図2】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

"410" (493 aa) vs. Human angiopoietin-2 (496 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
28.2% identity; Global alignment score: 662

	10	20	30	40	50	
410	MRPLCVTCWVLGL--LAAMGAVAGQEQDGFEETEGSPREFIYLNRYKRAGESQDKCTYTF					
Ang2	M-----WQIVFFTLSCDLVLAAYNNFRKSMDSIGK-----KQYQVQHGSCSYTF					
	10	20	30		40	
	60	70	80	90		
410	IVPQQ---RVTGAICV-NSKEPEVLLENRVHKQELELLNN-----ELLK-----					
Ang2	LLPEMDNCRSSSSPYVSNAVRDAPLEYDDSVQRLQVLENIMENNTQWLMKLENYIQDNM					
	50	60	70	80	90	100
	100	110	120	130	140	150
410	QKRQIETLQQLVEVDGGIVSEVKL-LRKESRNMSRVTQLYQMLLHEIIRKR----DNAL					
Ang2	KKEMVEIQQQNAVQNQTAVMIEIGTNLLNQTAEQTRKLTDVEAQVLNQTRLELQLLEHSL					
	110	120	130	140	150	160
	160	170	180	190	200	210
410	ELSQLENRLNQTAADMQLASKYKDLEHKYQHLATLAHNQSEIIAQLEEHQRVPSARPV					
Ang2	STNKLEKQILDQTSIEINKLQDKNSFLEKK----VLAMEDKHII-QL---QSIKEEKDQ					
	170	180	190	200		210
	220	230	240	250	260	
410	PQPPPAAPPRVYQPPTYNRIINQISTNEIQSDQN--LKVLPPPLPTMPTLTSL--PSSTD					
Ang2	LQVLVSKQNSIIIELEKKIVTATVNNNSVLQKQQHDLMETVNLLTMMSTSNSAKDPTVAK					
	220	230	240	250	260	270
	270	280	290	300	310	320
410	KPSGPWRDCLQALEDGHDTSSIYLVKPENTNRLMQVWCDQRHDPGGWTVIQRRRLGSVNF					
Ang2	EEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTLTFPNSTEEIKAYCDMEAGGGWTIQRRREDGSVDF					
	280	290	300	310	320	330
	330	340	350	360	370	380
410	FRNWETYKQGFGNIDGEYWLGLENIYLTNQGNYKLLVTMEDWSGRKVFAEYASFRLEPE					
Ang2	QRTWKEYKVGFGNPNSGEYWLGNEFVSQLTNQQRVYVLKIHLKDWEgneayslyehfylsse					
	340	350	360	370	380	390
	390	400	410	420	430	440
410	SEYYKLRLGRYHGNAGD-SFTWHNGKQFTTLDRDHVDVTGNCAHYQKGWWYNACAHSNL					
Ang2	ELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQPGNDFSTKDGNDKICKCSQMLTGGWWFDACGPSNL					
	400	410	420	430	440	450
	450	460	470	480	490	
410	NGWYRGGHYRSRYQDGVYWAERFGGSYSLKVVMMIRPNPNTFH					
Ang2	NGMYYPQRQNTNKF-NGIKWYYWKGSGYSLKATTMMIRPAD---F					
	460	470	480	490		

【図3】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

"NEW" (470 aa) vs. Human angiopoietin-1 (498 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
28.8% identity; Global alignment score: 580

	10	20	30	40	
NEW	MGKPWLRLA—QLLLLLGAS-----	WARAGAPRCTYTFVLPPQKFTGAVCWSG			
Ang1	: : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : : : : : : : :			
	MTVFLSFAFLAILTHIGCSNQRSPENSGRRYNRIQHGQCAYTFILPEH---DGNC---				
	10 20 30 40 50				
	50	60	70	80	90 100
NEW	PASTRATPEANASELAALRMRVGRHEELLRELQRLAAADGAVAGEVRALRKESRGLSAR				
Ang1	---RESTTDQYNTNAL---QRDAPHVEPDFSSQKLQHLHVMENYTQWLQKLENYIVEN				
	60 70 80 90 100				
	110	120	130	140	150 160
NEW	LGQLRAQLQHEAGPG-AGPGADLGAEPAAALLGERVLNASAEAQRAARFH-QL---D				
Ang1	: : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : : : : : : : :			
	MKSEMAQIQQNAVQNHTATMLEIGTSLLSQTAEQTRKLTDVETQVLNQTSRLEIQLLENS				
	110 120 130 140 150 160				
	170	180	190	200	
NEW	VKFRELAQLVTQQSSLIAR-----LERLCPGGAGGQQQVLPP-----PPLVPVVVR				
Ang1	... : : : : : : : : : : : : : : :	... : : : : : : : : : : : : : : :			
	LSTYKLEKQLLQQTNIELKIHEKNSLLEHKILEMEGKHKEELDTLKEEKENLQGLV-TRQ				
	170 180 190 200 210 220				
	210	220	230	240	250
NEW	VGSTSRTSRMLDPAPEPQRDQTQRQQEPMASPMPAGHPAVP--TKP---VG-----P				
Ang1	TYIIQELEKQLNRATT-NNSVLQKQQLEL---MDTVHNLVNLCTKEGVLLKGKREEEKP				
	230 240 250 260 270 280				
	260	270	280	290	300 310
NEW	WQDCAEARQAGHEQSGVYELRVGR-HVVS梧CEQQLEGGGWTVIQRRQDGSVNFTTWQ				
Ang1	... : : : : : : : : : : : : : : :	... : : : : : : : : : : : : : : :			
	FRDCADVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKVFCCNMDVNGGGWTVIQHREDGSDFQRGWK				
	290 300 310 320 330 340				
	320	330	340	350	360 370
NEW	HYKAGFGRPDGEYLGLEPVYQLTSRGDHELLVLLEDWGGRGARAHYDGFSLPEDHYR				
Ang1	: : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : : : : : : : :			
	EYKMGFGNPSEGYWLGEFIFIAITSQRQYMLRIELMDWEGRNRAYSQYDRFHIGNEKQNYR				
	350 360 370 380 390 400				
	380	390	400	410	420 430
NEW	LRLGQYHGDAG--DSLWSHNDKPFSTVDRDRDSYSGNCALYQRGGWWYHACAHSNLNGVW				
Ang1	: : : : : : : : : : : : : : : :	: : : : : : : : : : : : : : : :			
	LYLKHTGTAGKQSSLILHG-ADFSTKOADNDNCMKCALMLTGGWWFDACGPSNLNGMF				
	410 420 430 440 450 460				
	440	450	460	470	
NEW	HHGGHYRSRYQDGVYWAERFGGAYSLRKAAMLIIRPLKL				
Ang1	... : : : : : : : : : : : : : : :	... : : : : : : : : : : : : : : :			
	YTAGQNHGKL-NGIKWHYFKGPSYSLRSTTMMIRPLDF				
	470 480 490				

【図4】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0. Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

"NEW" (470 aa) vs. Human angiopoietin-2 (496 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
27.2% identity; Global alignment score: 578

	10	20	30	40	
NEW	MGKPWLRLQLLLLLGASWAR	-----AGAPR-----	CTYTFVLPPQK--FTGAVCW		
Ang2	MWQIVFFTLCSDLVLAAAYNNFRKSMDSIGKKQYQVQHGSCSYTFLLPEMDNCRSSSPY		
	10	20	30	40	50
	50	60	70	80	90
NEW	SGPASTRATPEAANAS--ELAALRMVRGVHEELLRELQRЛАADGAVAGEVRALRKESRG	100
Ang2	VNAVQRDAPLEYDDSVQRQLVLENIMENNTQWLMKLENYIQ-DNMKKEMVEIQQNAVQN	
	70	80	90	100	110
	110	120	130	140	150
NEW	LSARLGQLRAQLQHEAGPGAGPGADLGAE	-----PAAALALLGERVLNASAEAQ--RAAA			
Ang2	QTAVMIEIGTNLLNQTAEQTRKLTDVEAQVLNQTRLELQLLEHSLSTNKLEKQILDQTS	
	120	130	140	150	160
	160	170	180	190	200
NEW	RFHQLDVKFRELALQV-TQQSSIARLERLCPGGAGGQQQVLPVPPVRLVGSTS	210
Ang2	EINKLQDKNSFLEKKVLAQEDKHIIQLQSIKEEKDQLQVLVSKQNSIIEELEKKIVTATV	
	180	190	200	210	220
	220	230	240	250	260
NEW	DTSRMLDPAPEPQRDQTQRQQEPMASPMAGHPAVPTKPVGPWQDCAEARQAGHEQSGVY	270
Ang2	NNS-VLQKQQHDLMETVNLLTMMSTSNSAKDPTVAKEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIY	
	240	250	260	270	280
	280	290	300	310	320
NEW	ELRVGRHV--VSVCCEQQLEGGGWTVIQRQQDGSVNFFTWTQHYKAGFGRPDGEYWLGLE	330
Ang2	TLTFPNSTEEIKAYCDMEAGGGGGWTIIQRREDGSVDFQRTWKEYKVGFGNPSGEYWLGNE	
	300	310	320	330	340
	340	350	360	370	380
NEW	PVYQLTSRGDHELLVLLEDWGGGRARAHYDGFSLPEDHYRLRLGQYHGDAG--DSLW	390
Ang2	FVSQLTNQQRYVLKIHLKDWEQNEAYSLYEHFYLSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQ	
	360	370	380	390	400
	400	410	420	430	440
NEW	HNDKPFSTVDRDRDSYSGNCALYQRGGWYHACAHNSNLNGVWHGGHYRSRYQDGVYWAЕ	450
Ang2	PGND-FSTKDGNDKCICKCSQMLTGGWWFDACGPSNLNGMYPQRQNTNKF-NGIKWYY	
	420	430	440	450	460
	460	470			
NEW	FRGGAYSLRKAAMLIRPLKL			
Ang2	WKGSYSLKATTMMIRPADF			
	480	490			

【図5】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

fibrinogen domain:

"410" (186 aa) vs. Human angiopoietin-1 (187 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
41.0% identity; Global alignment score: 530

	10	20	30	40	50	60
410	WRDCLQALEDGHDTSSIYLVKPENTNRLMQVWCQRHDPGGWTVIQRRRLDGSVNFFRNWE
Ang1	FRDCADAVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKKVFCNMDVNGGGWTVIQHREDGSLDFQRGWK
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
410	TYKQGFGNIDGEYWLGLENIYWLTNQGNYKLLVTMEDWSGRKVFAEYASFRLEPESEYYK
Ang1	EYKMGFGNPSGEYWLGNEFIFIAITSQRQYMLRIELMDWEGNRAYSQYDRFHIGNEKQNYR
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	
410	LRLGRYHGNAG--DSFTWHNGKQFTTLDRDHVYTGNCAHYQKGGWWYNACAHSNLNGVW	
Ang1	LYLKHTGTAGKQSSLILH-GADFSTKDADNDNCMCKCALMLTGGWWFDACGPSNLNGMF	
	130	140	150	160	170	
	180					
410	YRGGHYRS					
Ang1	YTAGQNHG					
	180					

【図6】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

fibrinogen domain:

"410" (186 aa) vs. Human angiopoietin-2 (187 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
41.2% identity; Global alignment score: 536

	10	20	30	40	50	60
410	WRDCLQALEDGHDTSSIYLVKPENTNRLMQVWCDQRHDPGGWTVIQRRLDGSVNFFRNWE					
Ang2	FRDCAEVFKSGHTTNGIYTLPFPNSTEEIKAYCDMEAGGGGWTIIQRREDGSVDFQRTWK					
	10	20	30	40	50	60
410	TYKQGFGNIDGEYWLGLENIYWLTQNQNYKLLVTMEDWSGRKVFAEYASFRLEPESEYYK					
Ang2	EYKVGFGNPSPGEYWLGNEFVSQLTNQQRYVLKIHLKDWEgneayslyehfylsseelnyr					
	70	80	90	100	110	120
410	LRLGRYHGNAGD-SFTWHNGKQFTTLDRDHVDVTGNCAHYQKGGWWYNACAHSNLNGVWY					
Ang2	IHLKGLTAGKISSISQPGNDFSTKDGDNDCICKCSQMLTGWWFDACGPSNLNGMY					
	130	140	150	160	170	
410	RGGHYRS					
Ang2	PQRQNTN					

【図7】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

fibrinogen domain:

"NEW" (185 aa) vs. Human angiopoietin-1 (187 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
42.9% identity; Global alignment score: 531

	10	20	30	40	50	
NEW	WQDCAEARQAGHEQSGVYELRVGR--	HVVSVWCEQQLEGGGWTVIQRQRQDGSVNFFTTWQ				
Ang1	FRDCADVYQAGFNKSGIYTIYINNMPEPKVFCNMDVNGGGWTVIQHREDGSLDFQRGWK					
	10	20	30	40	50	60
	60	70	80	90	100	110
NEW	HYKAGFGRPDGEYWLGLEPVYQLTSRGDHELLVLLLEDWGGRGARAHYDGFSLPESDHYR					
Ang1	EYKMGFGNPSGEYWLGNEFIFAITSRQRQYMLRIELMDWEGNRAYSQYDRFHIGNEKQNYR					
	70	80	90	100	110	120
	120	130	140	150	160	170
NEW	LRLGQYHGDA--DSLWHNDKPFSTVDRDRDSYSGNCALYQRGGWWYHACAHSNLNGVW					
Ang1	LYLKQHTGTAGKQSSLILHG-ADFSTKDADNDNCMCKCALMLTGGWWFDACGPSNLNGMF					
	130	140	150	160	170	
	180					
NEW	HHGGHYRSR					
Ang1	YTAGQNHG-					
	180					

【図8】

ALIGN calculates a global alignment of two sequences
version 2.0u Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989)

fibrinogen domain:

"NEW" (185 aa) vs. Human angiopoietin-2 (187 aa)

scoring matrix: BLOSUM50, gap penalties: -12/-2
41.8% identity; Global alignment score: 507

	10	20	30	40	50	
NEW	WQDCAEARQAGHEQSGVYELRVGRHV--VSVWCEQQLEGGGWTVIQRQRQDGSVNFTTWO					
Ang2	FRDCAEVFKSGHTTNGIYTTLFPNSTEEIKAYCDMEAGGGGWIIQRREDGSVDFQRTWK					
	10	20	30	40	50	60
NEW	HYKAGFGRPDGEYWLGLEPVYQLTSRGDHELLVLEDWGGRRGARAHYDGFSLPESDHYR					
Ang2	EYKVGFGNPSGEYWLGNEFVSQLTNQQRYVLKIHLKDWEGLNEAYSLYEHFYLSSEELNYR					
	60	70	80	90	100	110
NEW	70	80	90	100	110	120
Ang2	70	80	90	100	110	120
	120	130	140	150	160	170
NEW	LRLGQYHGDAG--DSLWHNDKPFSTVDRDRDSYSGNCALYQRGGWWYHACAHSNLNGVW					
Ang2	IHLKGLTGTAGKISSISQPGND-FSTKDGDNDCICKCSQMLTGWWWFACGPSNLNGMY					
	130	140	150	160	170	
NEW	180					
Ang2	YPQ-RQNTN					
	180					

フロントページの続き

(51) Int.C1. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
	1/21	1/21	4 H 0 4 5
	5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P	21/02	C 1 2 Q 1/02	A
C 1 2 Q	1/02	1/68	6 0 9 F
	1/68	A 6 1 K 31/00	6 2 7 A
// A 6 1 P	9/10		6 2 9 A
	27/02		6 3 5
	29/00		
	35/00	39/395	D
A 6 1 K	38/00	48/00	N
	39/395	C 1 2 N 5/00	A
	48/00	A 6 1 K 37/02	

(72)発明者 太田 紀夫

神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-8-701

Fターム(参考) 4B024 BA21 BA80 CA04 CA20 DA01
DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
4B063 QA01 QA05 QQ08 QR32 QR35
QR40 QR48 QR55 QR62 QS34
4B064 AG01 AG02 CA01 CA19 CC01
CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA88X AA90X
AA93Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44 CA46
4C084 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01
BA22 BA44 DA39 DB57 ZA262
ZA362
4C085 AA13 AA14 BB07 DD63 DD88
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40
DA01 DA75 EA20 EA50 FA74